Analys av (1→3)-β-D-glukan i serum

FUNGITELL® STAT

Bruksanvisning

Rx only

Σ 5-9

CE

ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
Telefon: (508) 540-3444
Gratissamtal: (888) 395-2221
Fax: (508) 540-8680
Teknisk support: (800) 848-3248
Kundtjänst: (800) 525-8378

PN002603-sv Rev002 2020-03-11

Besök www.acciusa.com för bruksanvisning på ditt språk.

AVSEDD ANVÄNDNING

Fungitell® STAT-analysen är en proteaszymogenbaserad, kolorimetrisk analys för kvalitativ detektering av (1→3) β-D-glukan i serum hos patienter med symtom på, eller medicinska tillstånd som predisponerar patienten för, invasiv svampinfektion. Serumkoncentrationen av (1→3)-β-D-glukan, en viktig cellväggskomponent i olika medicinskt viktiga svampar[1], kan användas som ett hjälpmedel för diagnos av envisa mykoser och fungemier[2]. Ett positivt resultat anger inte vilket svampsläkte som kan ha orsakat infektionen.

(1→3)-β-D-glukans indexvärden bör användas i samband med andra diagnostiska procedurer som mikrobiologisk odling, histologisk undersökning av biopsiprover och radiologisk undersökning.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Det finns en ökande förekomst med svampinfektioner av opportunistiska patogener, särskilt hos patienter med försvagat immunförsvar[3,4,5]. Invasiva svampsjukdomar, såsom opportunistiska infektioner, är vanliga hos patienter med hematologisk malignitet och AIDS och står för ett ökande antal nosokomiala infektioner, särskilt bland mottagare av organtransplantat och andra patienter som får immunosuppressiva behandlingar[6,7]. Många svampsjukdomar förvärvas genom inandning av svampsporer som härrör från marken, växtdetritus, luftbehandlingssystem och/eller exponerade ytor. Vissa opportunistiska svampar finns i/på mänsklig hud, i tarmkanalen och i slemhinnor[8,9]. Diagnos av invasiva mykoser och fungemier baseras vanligtvis på ospecifika diagnostiska eller radiologiska tekniker. Nyligen har biologiska markörer för svampinfektion lagts till de tillgängliga diagnostiska metoderna[2]

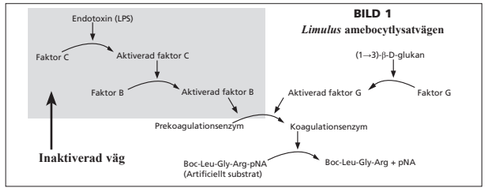
Opportunistiska svamppatogener är bl.a. *Candida spp., Aspergillus spp., Fusarium spp., Trichosporon spp., Saccharomyces cerevisiae, Acremonium spp., Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Sporothrix schenckii, Exserohilum rostratum* och *Pneumocystis jirovecii.* Den (1→3)-β-D-glukan som bildas av dessa organismer, och andra, kan påvisas med Fungitell® STAT-analysen[2,10,11].

PRINCIPER FÖR PROCEDUREN

Fungitell® STAT-analysen är en modifiering av Fungitell®-analysens format. Fungitell® STAT-analysen utvecklades för att svara på behovet av ett testformat för engångsbruk och mindre kit-storlek jämfört med 96-brunnarsplattan i Fungitell®-analysen.

Fungitell® STAT-analysen ger en kvalitativ påvisning av (1→3)-β-D-glukan. Analysen är baserad på en modifiering av *Limulus* amebocytlysat(LAL)-vägen[12,13,14,15], **Bild 1**. Fungitell® STAT-reagenset har modifierats för att eliminera bakteriell endotoxinreaktivitet och därmed endast reagera på (1→3)-β-D-glukan genom den faktor G-medierade sidan av vägen. (1→3)-β-D-glukan aktiverar faktor G, en serinproteaszymogen. Den aktiverade faktor G omvandlar det inaktiva pro-koagulerande enzymet till det aktivt koagulerande enzymet, vilket i sin tur spjälkar para-nitroanilid Bo-Leu-Gly-Arg-pNA och skapar en kromofor, para-nitroanilin (pNA), som absorberar vid 405 nm. Den kinetiska Fungitell® STAT-analysen, som beskrivs nedan, är baserad på bestämningen av hastigheten för ökningen i optisk densitet som orsakas av ett prov. Denna hastighet jämförs med ökningstakten för optisk densitet i Fungitell® STAT-standarden för beräkning av ett index. Detta indexvärde för ett patientprov tolkas kvalitativt som ett negativt, oklart eller positivt resultat i enlighet med intervallerna för indexvärde som anges i **Tabell 1** nedan.

BILD 1
***Limulus* amebocytlysatvägen**



TABELL 1 FUNGITELL® STAT INDEXINTERVALL

Resultat	Indexvärde
Negativt	≤ 0,74
Oklart	0,75–1,1
Positivt	≥ 1,2

MATERIAL SOM LEVERERAS MED FUNGITELL® STAT-PRODUKTEN

Fungitell® STAT-produkten är avsedd för *in vitro*-diagnostisk användning. Följande material som levereras med varje produkt är tillräckligt för totalt 10 reaktioner (baserat på de 10 rören med Fungitell® STAT-reagens). Varje produkt innehåller även 5 rör med Fungitell® STAT-standard och kan därför stödja upp till fem körningar när 1 Fungitell® STAT-standarrör och 1 patientprov testas per körning. Alternativt kan ett Fungitell® STAT-standardrör köras med upp till 9 patientprover.

1. Fungitell® STAT-reagens, en frystorkad (1→3)-β-D-glukanspecifik LAL (10 rör)
   Fungitell® STAT-reagens är fritt från störande nivåer av (1→3)-β-D-glukan.
2. Fungitell® STAT-standard (5 rör) med den för partiet # specifika rekonstitueringsvolymen på etiketten
3. Bruksanvisning
4. Visuell snabbguide

MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Alla material måste vara fria från störande glukan. Glasvaror måste depyrogeneras i torr värme under minst 7 timmar vid minst 235 °C (eller en validerad ekvivalent) för att anses vara lämpliga för användning.

1. LAL reagensvatten* (5,5 ml rör, katalog # W0051-10)
2. Alkalisk lösning för förbehandling 0,125 M KOH och 0,6 M KCl * (2,5 ml rör, katalog # APS51-5)
3. Pipetter för 20–200 mikroliter och 100–1000 mikroliter
4. Pipettspetsar* (250 mikroliter katalog # PPT25 och 1000 mikroliter katalog # PPT10)
5. Långa pipettspetsar* (20–200 mikroliter, katalog # TPT50)
6. Provrör* för förberedelse av patientprover och kombinering av förbehandlingslösning för serum. (12 x 75 mm, katalog # TB240-5)
7. Rörläsare och programvara för kinetisk analys
   a) En automatiserad 8-brunnars rörläsare för inkubation från Lab Kinetics (PKF08-instrument) och programvara från Beta Glucan Analytics (BG Analytics™) som är levererad av Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) katalog # PKF08-PKG** **eller**
   b) Rörläsare för inkubation (37 °C), som kan läsa av vid 405 nm och 495 nm med ett intervall av minst 0–1,0 absorbansenheter och som passar för rör med en diameter av 12 mm; i kombination med lämplig datorbaserad programvara för kinetisk analys som kan observera och analysera reaktionskinetik samt stödja översynen av kriterierna som anges i avsnittet om kvalitetskontroll i bruksanvisningen.
8. Sterila, glukanfria lagringsrör med skruvlock för uppdelning av prover i lika delar (de flesta rör som är certifierade för att vara RNas-, DNas- och pyrogenfria är fria från störande nivåer av (1→3) -β-D-glukan).
9. Parafilm®

**Dessa produkter, levererade av Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), är certifierade att vara fria från störande glukaner.*

***Utskrifter av både BG Analytics ™programvara och bruksanvisningar för PKF08-instrument kan hämtas hem från ACC:s webbplats: www.acciusa.com.*

Försiktighet – glaspipetter med bomullsproppar och mikropipettspetsar med cellulosafilter är potentiella källor till glukan-kontaminering.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Denna produkt är avsedd för IN VITRO-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING

Fungitell® STAT-analysen kräver noggrann uppmärksamhet på teknik och testmiljö. Grundlig utbildning av teknikern i analysmetod och undvikande av kontaminering är avgörande för analysens effektivitet.

1. Vissa svamparter producerar mycket låga nivåer av (1→3)-β-D-glukan och upptäcks vanligtvis inte med Fungitell® STAT-analysen. Bland dessa märks släktet *Cryptococcus*[16,17] liksom *Mucorales* såsom *Absidia*, *Mucor* och *Rhizopus*[1,17]. Dessutom producerar *Blastomyces dermatididis*, i sin jästform, låga nivåer av (1→3) -β-D-glukan och upptäcks därför vanligtvis inte med Fungitell® STAT-reagenset[18].
2. Pipettera inte något material med munnen. Rök inte, ät inte eller drick inte i områden där prover eller kitets reagens hanteras. Följ företagets och lokala säkerhetsföreskrifter.
3. Inrätta en ren miljö för att utföra analysen. Använd material och reagens som är certifierade att vara fria från påvisbara bakgrundsnivåer av (1→3)-β-D-glukan. Observera att såväl glukan- som svampkontaminering från människokroppen, kläder, behållare, vatten och luftburet damm kan orsaka störningar i Fungitell® STAT-analysen. Cellulosamaterial som gasväv, pappersdukar och kartong kan bidra med (1→3)-β-D-glukan till miljön där analysen utförs.
4. Använd inte material efter utgångsdatum.
5. Missfärgade eller grumliga prover, såsom de som är gravt hemolyserade, lipemiska eller som innehåller mycket bilirubin kan orsaka optisk interferens med analysen. Om sådana prover testas, bör testresultaten granskas för tecken på optisk interferens och/eller ovanliga kinetiska mönster.
6. Använd lämpliga skyddskläder och puderfria handskar vid hantering av patientprover.
7. Serum från hemodialyspatienter kan innehålla höga nivåer av (1→3)-β-D-glukan, när vissa cellulosadialysmembran används[19,20,38]. Hemodialys med cellulosatriacetatmembran, polysulfonmembran eller polymetylmetakrylatmembran verkar inte störa analysen.
8. Förbandsgasväv och tvättsvampar kan läcka höga nivåer av (1→3)-β-D-glukan, som kan bidra till ett kontamineringsbaserat kortvarigt positivt resultat i Fungitell®-analysen, vilket har observerats hos postoperativa patienter[21,22].
9. Blodfraktioneringsprodukter som intravenöst immunglobulin och albumin kan även innehålla (1→3)-β-D-glukan vilket, om det injiceras eller infunderas, kommer att höja serumtitrarna av (1→3)-β-D-glukan under ett antal dagar[23].
10. Produkter med skadat innehåll ska inte användas.
11. Material som utsätts för potentiellt kontaminerade (patogeninnehållande) vätskor måste kasseras på ett sätt som överensstämmer med lokala föreskrifter.

FÖRVARING AV REAGENS

Förvara alla reagens som de levereras, vid 2–8 °C i mörker. Fungitell® STAT-reagens och Fungitell® STAT-standard ska användas inom 1 timme efter rekonstituering.

HANTERING AV PROV

1. Provtagning: Blodprover kan tas i sterila serumrör eller serumseparationsrör (SST ”serum separator tubes”) för framställning av serum.
2. Förvaring av prov: Prover av serum kan tillfälligt förvaras vid 2–8 °C före analys eller frysas vid -20 °C eller kallare för förvaring på längre sikt.
3. Provetikett: Prover ska tydligt märkas enligt institutionens godkända praxis.

PROCEDUR

En visuell snabbguide med en sammanfattning om det automatiska PKF08-instrumentet och användningen av BG Analytics™ programvara ingår även i Fungitell® STAT:s produktpaket.

Ett antal av stegen som beskrivs i proceduren nedan automatiseras vid användning av PKF08-instrumentet och BG Analytics™ programvara och innefattar: instrumentinställning, kvalitetskontroll och tolkning av resultat. Se bruksanvisningen för BG Analytics™ programvara eller kontakta tillverkaren för ytterligare information.

Observera:

- *Följ god laboratoriepraxis enligt lokala föreskrifter. Denna analys är känslig för kontaminering och dålig noggrannhet med pipetten.*
- *Det rekommenderas att utföra steg 3–5 och 7 i ett biologiskt säkerhetsskåp för att öka operatörens säkerhet under arbetet med patientprover och för att minska risken för kontaminering med (1 → 3)-β-D-glukan från miljön under proceduren.*
- *För att minska onödiga förflyttningar av glasrören när de förs in i och ut ur det biologiska säkerhetsskåpet rekommenderas det att vortexblandaren ställs in i det biologiska säkerhetsskåpet (så länge det kritiska luftflödet upprätthålls).*
- *Det rekommenderas att använda långa pipettspetsar för att förhindra korskontaminering mellan rören.*
- *En Fungitell® STAT-standard (rött lock och röd etikett) ska alltid behandlas under samma förhållanden och vid samma tid som patientprovet/-proverna inom en körning. Detta är kritiskt, eftersom resultatet av analysen är ett index (prov/standard) för de kinetiska reaktionshastigheterna (eller lutningarna, OD/sek) för patientprovet och Fungitell® STAT-standarden.*
- *Det rekommenderas att använda två provrörsställ under proceduren, ett för provberedningsrören (steg 4–6) och ett för reagensrören (steg 7–8). Detta hjälper till att minska risken för sammanblandning av rören och korskontaminering under proceduren.*
- *Det rekommenderas att konsekvent placera Fungitell® STAT-standarden på en och samma plats i provrörsställen, inkubatorn och läsaren. När du använder PKF08-instrumentet och BG Analytics ™ programvara, använd den första brunnen till vänster som är märkt "Standard".*
- *Bekräfta vid slutet av varje blandningssteg visuellt att lösningen är homogent blandad.*
- *Kör inte Fungitell® STAT-reagenset för hårt i blandaren. En maximal inställning på 2000 varv per minut rekommenderas för alla vortexblandare. Blanda inte i mer än 5 sekunder.*

1. Instrumentinställning

Inställningarna kan variera med olika instrument och programvaror. I allmänhet bör följande villkor vara uppfyllda: instrumentet ska kunna uppnå och hålla en temperatur av 37 °C ±1 °C. Instrumentet och programvaran måste kunna läsa optisk densitet över tid (kinetisk) vid två våglängder. Specifikt bör dessa våglängder ställas in till 405 nm och 495 nm. Ställ in kinetikläget till en läsperiod på 40 minuter (2400 sekunder). Ställ in kinetikavläsningsintervallet till det minimum som tillåts av programvaran/instrumentet under 40 minutersperioden för testet och initiera avläsning vid insättning av provet. Kontrollera programvarans manual för att bestämma hur man beräknar en mätning av hastighet (lutning) från datamängden. För syftet med detta test uppnås detta generellt genom att man utför en linjär regression av kinetiska data inom den föreslagna tidsramen. Ställ in den linjära regressionsberäkningen att utföras över intervallet mellan 1900 och 2400 sekunder med hjälp av ”slice”-funktionen i programvaran. Läsning bör påbörjas utan fördröjningstid.

2. Bekräfta den för Fungitell® STAT-standard sats # specifika informationen

a. För sats # specifika lösningsvolymer för rekonstituering och förbehandling finns på Fungitell® STAT-standards förpackningsetikett, på Fungitell® STAT-produktens certifikatet för analys och tillgängliga på ACC:s webbplats. Denna information kommer att krävas för slutförande av steg 5 nedan.
b. Det rekommenderas att innan proceduren påbörjas beakta den för sats # specifika informationen i den visuella snabbguiden som medföljer Fungitell® STAT-produkten.

Observera: *Varje produkt (par av Fungitell® STAT-standard och Fungitell® STAT-reagens) testas och släpps oberoende av varandra. Därför är det viktigt att beakta och använda den för varje par med sats # specifika informationen.*

3. Märk rören

a. Märk ett tomt rör för varje patientprov som ska testas.
b. Märk ett Fungitell® STAT-reagensrör för varje patientprov som ska testas.
c. Märk ett Fungitell® STAT-reagensrör för Fungitell® STAT-standard.

4. Förbered patientens provrör

a. Blanda patientprov i minst 20 sekunder för att säkerställa homogenitet.
   Observera: *Frysprocessen kan göra proven heterogena genom vattenutfrysning till den växande iskristallen och därmed avskilja lösta ämnen.*
b. Tillsätt patientprovet och alkalisk förbehandlingslösning till ett på lämpligt sätt märkt rör i förhållandet 1:4. De rekommenderade volymerna är 50 µl patientprov och 200 µl alkalisk förbehandlingslösning.
   Observera: *Den alkaliska förbehandlingslösningen omvandlar trippelhelixglukaner till ensträngade glukaner[4,13] vilka är mer reaktiva i analysen. Dessutom tjänar det alkaliska pH-värdet till att inaktivera serumproteaser och hämmare som kan störa analysen[24].*
c. Blanda i 15 sekunder och täck över.

5. Förbered Fungitell® STAT-standardröret

a. Rekonstituera ett rör med Fungitell® STAT-standard med den för sats # specifika volymen LAL reagensvatten och blanda i 15 sekunder.
b. Tillsätt den för sats # specifika volymen alkalisk förbehandlingslösning.
   Observera: *De för sats # specifika volymerna av rekonstituerings- och förbehandlingslösningar anges på Fungitell® STAT-standardens förpackningstetikett, på Fungitell® STAT-produktens certifikat för analys och är tillgängliga på ACC -webbsidan.*
c. Blanda i 15 sekunder och täck över.

6. Förbehandlande inkubation i rörläsaren

Inkubera patientens provrör (från steg 4) och Fungitell® STAT-standardröret (från steg 5) i 10 minuter vid 37 °C.

7. Förbered Fungitell® STAT-reagensrören

a. Rekonstituera vart och ett av Fungitell® STAT-reagensrören (märkta i steg 3 ovan) med 300 µl LAL reagensvatten.
b. Blanda försiktigt och inte längre än 5 sekunder.
   Observera: *Fungitell® STAT-reagenset innehåller ett antal aktiva proteiner som krävs för analysen och det rekommenderas att hantera lösningen försiktigt. En maximal inställning på 2000 varv per minut rekommenderas för alla vortexblandare. Blanda inte för länge.*
c. I slutet av preinkubationsbehandlingen:
   - Överför 75 µl av varje patientprovlösning till dess motsvarande Fungitell® STAT-reagensrör.
   - Överför 75 µl av Fungitell® STAT-standard till dess motsvarande Fungitell® STAT-reagensrör.
   - Blanda alla rör i högst 5 sekunder och täck över.

8. Starta körningen

a. Sätt rören i rörläsaren och kontrollera att alla sitter i avsedd brunn.
b. Påbörja den kinetiska avläsningen under en period av 40 minuter vid 37 °C.

9. Granska kriterierna för kvalitetskontroll

Se avsnittet för kvalitetskontroll nedan och ***Bild 2****.*

10. Tolkning av resultat

Se avsnittet för tolkning av resultat nedan och ***Bild 3****.*

AVFALLSHANTERING I SLUTET AV PROCEDUREN

- Det rekommenderas att de öppna rören med alkalisk förbehandlingslösning och LAL reagensvatten avfallshanteras enligt dina laboratorieföreskrifter. Använd inte dessa material i mer än en körning för att undvika potentiell kontaminering.
- Som en del av produkttillverkningen lanseras Fungitell® STAT-reagens och Fungitell® STAT-standard som en sammanslagen sats och på grund av detta ska komponenterna Fungitell® STAT-reagens och Fungitell® STAT-standard från olika produktsatser inte användas. När alla Fungitell® STAT-reagensrör i en förpackning har använts, rekommenderas det därför att eventuellt återstående rör med Fungitell® STAT-standard kasseras.

KVALITETSKONTROLL

- **För alla brunnsnummer,** bekräfta tilldelning av Fungitell® STAT-standard eller prov #
- **För Fungitell® STAT-standardresultatet**
  1. korrelationskoefficienten (r) måste vara ≥ 0,980 och
  2. lutningen måste ligga inom det förväntade intervallet 0,00010–0,00024 OD/sekund.

  Om Fungitell® STAT-standardresultatet inte uppfyller kriterierna #1 och #2, är körningen ogiltig och alla prover måste köras igen.
- **För alla resultat från patientprover:**

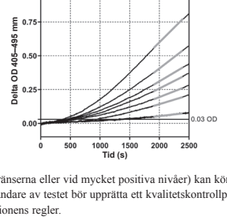
  A. Avgör om resultatet är utanför området för analysindex
  - Resultatet är troligtvis utanför intervallet på den positiva sidan om:
    - Y-skärningen är positiv och
    - den kinetiska kurvan passerar 0,4 OD före 1000 sekunder.
  - Resultatet är troligtvis utanför intervallet på den negativa sidan om:
    - den kinetiska kurvan är positiv efter 500 sekunder och
    - har en OD >0,03 och <0,07 i slutet av testet.

  Om provresultatet uppfyller båda kriterierna för antingen den positiva eller negativa sidan utanför intervallet, behöver de allmänna QC-kriterierna nedan inte fyllas i, och indexvärdet ska ***inte*** *beräknas. Alla resultat utanför intervallet på den positiva sidan ska rapporteras som "Positiva" och alla resultat utanför intervallet på den negativa sidan ska rapporteras som "Negativa".*

  B. Om resultatet inte uppfyller kriterierna för att ligga utanför intervallet, verifiera den allmänna QC:
  1. den kinetiska kurvan måste vara positiv efter 500 sekunder,
  2. den kinetiska kurvan måste ha en OD ≥0,03 i slutet av testet,
  3. lutningen måste vara numeriskt positiv,
  4. korrelationskoefficienten (r) måste vara ≥0,980 och
  5. den kinetiska kurvan måste ha en uppåt ökande kurvform som överensstämmer med exemplen som visas i **Bild 2**.

Om provresultatet inte uppfyller alla allmänna QC-kriterier # 1–5, är provresultatet ogiltigt och provet måste testas igen. Alternativt bör en annan metod användas.

BILD 2
EXEMPEL PÅ LÄMPLIGA FORMER PÅ KINETIKKURVAN



Kontrollprover (negativa, nära analysgränserna eller vid mycket positiva nivåer) kan köras för att verifiera att reagenset och analyserna fungerar korrekt. Varje användare av testet bör upprätta ett kvalitetskontrollprogram för att säkerställa kunskaper i testets utförande i enlighet med institutionens regler.

TOLKNING AV RESULTAT

Fungitell® STAT:s testresultat bör användas som ett hjälpmedel vid diagnos av invasiv svampinfektion. Värden för patientprov och Fungitell® STAT-standard härrör från beräkning av lutningen (hastigheten) mellan 1900 och 2400 från delta OD 405–495 nm-resultat. Fungitell® STAT:s indexresultat härleds genom att hastigheten (lutningen) för patientprovet delas med med hastigheten (lutningen) för Fungitell® STAT-standarden (*se **Bild 3***). Indexresultaten sträcker sig från ungefär 0,4 till 3,5 och täcker hela standardkurvan (31–500 pg/ml) som baseras på Fungitell®-predicate. Fungitell® STAT:s indexvärden ska tolkas som beskrivs nedan:

NEGATIVT RESULTAT

Indexvärden ≤0,74 tolkas som negativa resultat.

OKLART RESULTAT

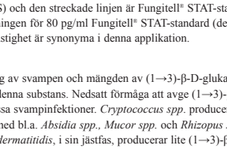
Indexvärden från 0,75 till 1,1 antyder en möjlig svampinfektion. Ytterligare provtagning och testning av sera rekommenderas. Frekventa provtagningar och tester förbättrar verktyget för diagnos.

POSITIVT RESULTAT

Indexvärden ≥1,2 tolkas som ett positivt resultat. Ett positivt resultat betyder att (1→3)-β-D-glukan påvisades. Ett positivt resultat definierar inte förekomsten av sjukdom och bör användas tillsammans med andra kliniska fynd för att fastställa en diagnos.

Laboratoriet som utför testet ska informera den beställande läkaren om att inte alla svampinfektioner leder till förhöjda nivåer av (1→3)-β-D-glukan i serum. Vissa svampar, exempelvis släktet *Cryptococcus*[16,17] producerar mycket låga nivåer av (1→3)-β-D-glukan. *Mucorales*, såsom *Absidia, Mucor* och *Rhizopus*[5,17] är inte kända för att producera (1→3)-β-D-glukan. På samma sätt producerar *Blastomyces dermatitidis,* i sin jästfas bara små mängder (1→3)-β-D-glukan och patienter med blastomykos har vanligtvis ej med Fungitell® STAT-analysen[18] påvisbara nivåer av (1→3)-β-D-glukan.

BILD 3
EXEMPEL PÅ KINETIKKURVOR OCH DATAANALYS FÖR FUNGITELL® STAT



Området som är markerat med grått är området för bestämning av lutningen (1900 till 2400 sekunder (s)), den heldragna linjen är ett exempel på patientprov (PS) och den streckade linjen är Fungitell® STAT-standard (STD). Provets lutning (det vill säga 0,00022 OD/s) dividerad med lutningen för 80 pg/ml Fungitell® STAT-standard (det vill säga 0,00016 OD/s) ger ett index på 1,4 för provet. Lutning och hastighet är synonyma i denna applikation.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Platsen för infektion[16]och inkapsling av svampen och mängden av (1→3)-β-D-glukan som bildas av vissa svampar kan påverka serumkoncentrationen av denna substans. Nedsatt förmåga att avge (1→3)-β-D-glukan till blodomloppet kan försämra förmågan att upptäcka vissa svampinfektioner. *Cryptococcus spp.* producerar låga halter av (1→3)-β-Dglukan[16,17]. *Mucorales*, med bl.a. *Absidia spp., Mucor spp.* och *Rhizopus spp.* är inte kända för att producera (1→3)-β-D-glukan[1,17].*Blastomyces dermatitidis*, i sin jästfas, producerar lite (1→3)-β-D-glukan, och testresultaten är vanligtvis negativa[18]. Denna information bör lämnas till remitterande läkare.

2. Vissa individer har indexvärden för (1→3)-β-D-glukan som faller in i den oklara zonen. I sådana fall rekommenderas ytterligare kontrolltester.

3. Frekvensen patienttester beror av den relativa risken för svampinfektion. Provtagning minst två till tre gånger per vecka rekommenderas för riskpatienter.

4. Positiva resultat har erhållits för hemodialyspatienter[19,20], för patienter som behandlas med vissa blodfraktioneringsprodukter såsom serumalbumin och immunoglobuliner och för prover eller personer som exponerats för glukaninnehållande gasväv och tvättvampar. Patienterna kräver 3–4 dagar för återställande av serums baslinjenivåer av (1→3)-β-D-glukan efter exponering under kirurgiska ingrepp för (1→3)-β-D-glukan i tvättsvampar och gasväv[21,22]. Följaktligen bör tidpunkten för provtagning på kirurgiska patienter anpassas härtill.

5. Prover erhållna med häl- eller fingerstick är oacceptabla, eftersom gasbindan med alkohol som används för att förbereda stickstället (och eventuellt även blodansamlingen på hudytan) har visats kontaminera proverna. I studier upp till dags datum har inga skillnader observerats mellan prover från en PICC-line och en venpunktion[23,26].

6. Testnivåer fastställdes för vuxna personer. Spädbarns och barns normala nivåer och gränsnivåer undersöks[27,28].

STÖRANDE ÄMNEN

Följande provbetingelser kan medföra ett inkorrekt resultat av Fungitell® STAT-analysen:

- Hemolys
- Prov grumligt på grund av lipemi
- Förekomsten av synligt bilirubin
- Grumligt serum
- Förhöjda nivåer av immunoglobulin G, som kan förekomma i serum på grund av multipelt melanom, kan leda till utfällning i reaktionsblandningen efter tillsats av Fungitell® STAT till det förbehandlade serumet[29].

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

En prospektiv multicenterstudie, som genomförts för att bestämma funktionskarakteristika för analys med Fungitell (predicate), visade att ß-glukanvärden är förhöjda vid en mängd svampinfektioner. När tecken och symtom föreligger vid 80 pg/ml eller däröver, ligger prediktionsvärdet för att individen är positiv för en svampinfektion mellan 74,4 och 91,7 %. I avsaknad av tecken och symtom vid mindre än 60 pg/ml låg de negativa prediktionsvärdena mellan 65,1 och 85,1 %.

Fungitell® STAT:s β-glukanindexvärden ≥1,2 tolkas som ett positivt resultat i linje med predicate-produkten Fungitell® :s gräns vid 80 pg/ml, medan indexvärden ≤0,74 tolkas som negativt resultat i linje med predicate-produkten Fungitell®:s gräns vid 60 pg/ml.

FUNKTIONSKARAKTERISTIKA

TEST FÖR METODJÄMFÖRELSE

Avidentifierade, frysta patientserumprover som tagits vid rutinmässig vård av populationen i fråga och mottagits på Beacon Diagnostics® Laboratory, Inc for Fungitell®:s predicate-test användes för metodjämförelsestudien. Beacon Diagnostics® Laboratory, Inc är en licensierad Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) laboratoriedel av ACC. En population av 488 avidentifierade patientserumprover ingick i studien med koncentrationer av (1→3)-β-D-glukan som är fördelade över hela intervallet för Fungitell®-predicates standardkurva. Dessa innefattade 309 prover som föll inom den negativa zonen i Fungitell®-predicates testresultat, 143 prover som föll inom Fungitell® -predicates positiva zon och 36 prover som föll inom den oklara zonen i Fungitell®-predicates (**Tabell 2**). Alla prover testades med både Fungitell® STAT- och Fungitell®-analyser i denna studie. När prover som faller inom den oklara zonen för Fungitell® STAT uteslöts från analys, fanns det 290 prover kvar för negativ procentuell överensstämmelsesanalys, och 119 prover kvar för positiv procentuell överensstämmelsesanalys.

TABELL 2
FUNGITELL® STAT:S PRESTANDA JÄMFÖRDA MED FUNGITELL®

		Fungitell® predicate			
		Negativ	Oklar	Positiv	Totalt
Fungitell® STAT	Negativ	283	17	1	301 (61,7 %)
	Oklar	19	17	24	60 (12,3 %)
	Positiv	7	2	118	127 (26,0 %)
	Totalt	309 (63,3 %)	36 (7,4 %)	143 (29,3%)	488 (100 %)
		NPA: 97,6 %* (283/290) 95 % CI: (95,4, 99,9)		**PPA:** 99,2 %* (118/119) 95 % CI: (95,4, 99,9)	

**Oklara (d.v.s. tvetydiga) resultat som inte ingår i analysen; om alla oklara resultat betraktas som diskordanta resultat (t.ex. falskt positiva eller falskt negativa), är prestanda som följer: PPA – 73,8 % (118/160), 95 % CI: (66,4 %, 80,0 %); NPA – 91,0 % (283/311), 95 % CI: (87,3 %, 93,7 %)*

NEGATIV PROCENTUELL ÖVERENSSTÄMMELSE

Tvåhundraåttiotre (283) av de 290 prover som var negativa när de testades med Fungitell® predicate-enheten var även negativa i Fungitell® STAT-analysen. Den beräknade negativa procentuella överensstämmelsen (NPA "negative percent agreement") med predicate-metoden var 97,6 % (95 % konfidensintervall: 95,4 %, 99,9 %) (**Tabell 2**)

POSITIV PROCENTUELL ÖVERENSSTÄMMELSE

Etthundraarton (118) av de 119 prover som var positiva när de testades med Fungitell® predicate-enheten var även positiva i Fungitell® STAT-analysen. Den beräknade positiva procentuella överensstämmelsen (PPA) med Fungitell® predicate-metoden var 99,2 % (95 % konfidensintervall: 95,4 %, 99,9 %) (**Tabell 2**).

REPRODUCERBARHETSSTUDIE

Fungitell® STAT utvärderades med avseende på reproducerbarhet genom tillsats till humant serum av (1→3)-β-D-glukan från *Saccharomyces cerevisiae* för att skapa en panel med fem medlemmar bestående av ett svagt negativt prov, ett starkt negativt prov (strax under den lägre gränsen på 0,74), ett oklart (tvetydigt) prov, ett svagt positivt prov (precis ovanför den övre gränsen på 1,2) och ett starkt positivt prov (~2x över den övre gränsen på 1,2). Panelen distribuerades till tre CLIA-laboratorier för testning med Fungitell® STAT-analysen. Varje laboratorium tillhandahöll 150 datapunkter (det vill säga 5 prover x triplikat per körning x två operatörer som utförde en körning per dag x 5 dagar), vilket gav totalt 450 datapunkter. Studiens indexmedelvärden som visas i **Tabell 3** nedan härleds från data från de tre laboratorierna. Kolumnen för procent positiv representerar procentandelen av prover för en given panelmedlem som föll inom den positiva zonen. Bland alla tre laboratorierna var procentandelen positiva resultaten 1,1 % för det svagt negativa provet, 0 % för det starkt negativa provet, 3,3 % för det oklara provet, 96,7 % för det svagt positiva provet och 100 % för det starkt positiva provet.

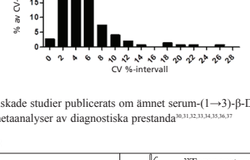
TABELL 3 RESULTAT AV REPRODUCERBARHETSSTUDIEN

Panelmedlem	Medelvärde för index	Standardavvikelse	% CV	Procent positiva (Antal pos./antal testade)
Svagt negativa	0,55	0,10	20,4 %	1,1 % (1/90)
Starkt negativa	0,75	0,08	11,1 %	0 % (0/90)
Oklara	0,94	0,10	11,1 %	3,3 % (3/90)
Svagt positiva	1,6	0,30	18,7 %	96,7 % (87/90)
Starkt positiva	2,6	0,40	15,4 %	100 % (90/90)

PRECISION

Variationen inom analysen (det vill säga % CV) varierade från 0,4 % till 26,8 % och inter-analysvärdena varierade från 11 till 20,4 %. Beträffande variationsintervallet intra-analys presenteras fördelningen av % CV intervallet nedan i **Bild 4**. Sammantaget var 94 % av CV-värdena 10 % eller mindre och 75 % av CV-värdena 6 % eller mindre.

BILD 4
FÖRDELNING AV % CV-VÄRDEN INTRA-ANALYS



METAANALYSER

Dessutom har många refereregranskade studier publicerats om ämnet serum-(1→3)-β-D-glukanbaserat stöd för diagnos av invasiv svampsjukdom, inklusive metaanalyser av diagnostiska prestanda[30,31,32,33,34,35,36,37]

FÖRKLARING AV SYMBOLER

	"Använd före"		"Temperaturgräns"
	"Innehållet räcker till 'N' tester"		"Tillverkare"
LOT	"Satskod"		"Läs bruksanvisningen"
IVD	"Enhet för medicinsk in vitro-diagnostik"	EC REP	"Auktoriserad representant"
REF	"Katalog nr"	CE	"CE-märkning"

℞only "Receptbelagt"

ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

Telefon: (508) 540-3444
Gratissamtal: (888) 395-2221
Fax: (508) 540-8680
Teknisk support: (800) 848-3248
Kundtjänst: (800) 525-8378

EC REP Associates of Cape Cod Europe GmbH, Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Tyskland

Representant i Storbritannien: Associates of Cape Cod, Int'l., Inc, Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Storbritannien

Australisk sponsor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Australien

Referenser

1. Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M. och Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. Medical Mycology 44: 267–272.
2. De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infectious disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Concensus Group. Clin. Inf. Dis. 46: 1813–1821.
3. Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infectious Dis. 1999: 1:247–261.
4. Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. New England Journal of Medicine. 1998: 338:1741–1751.
5. Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H. Yasuoka, A., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horichi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K. och Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 345: 17–20.
6. Fridkin, S.K. och Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin. Micro. Rev. 9: 499–511.
7. Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl. Infectious Dis. 2002: 4 (Suppl. 3):32–37
8. Lass-Florl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197–205.
9. Nucci, M. och Anaissie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295–306.
10. Litvintseva, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grgurich, D.E., Kerkering, T.M., Brandt, M.E. och Park, B.J. Utility of (1-3)-β-D-glucan testing for diagnostics and monitoring response to treatment during the multistate outbreak of fungal meningitis and other infections. J. Clin. Microbiol. 2015; 53:618–25.
11. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J. och Ostrosky-Zeichner, L. 2004. β-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. CID 39: 199–205.
12. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F. och Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1–32.
13. Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y. och Hashimoto, Y. 1991. Activation of a Limulus coagulation factor G by (1→3)-β-D-Glucans. Carbohydrate Res. 218:167–174.
14. Saito, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S. och Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1→3)-β-D-Glucans in the activation of coagulation factor G from Limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181–190.
15. Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y. och Saito, H. 1993. Activation of Limulus coagulation factor G by several (1→3)-β-D-Glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683–686.
16 . Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K-I., Ishikawa, N. och Hara, K. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. J. Clinical Microbiol. 33: 3115–3118.
17. Binder, U., Maurer, E. och Lass-Florl, C. 2014. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. Lin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl.6): 60–66.
18. Girouard, G., Lachance, C. och Pelletier, R. 2007. Observations of (1→3)-β-D-Glucan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by *Histoplasma* or *Blastomyces*. J. Med. Mycology 56: 1001–1002.
19. Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K. och Mimura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan level. Kidney International 60: 319–323.
20. Kato, A., Takita, T, Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y. och Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-β-D-Glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15–19.
21. Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakat, Y. och Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauze types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117–121.
22. Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J. och Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
23. Held J, Wagner D.β-d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in Pneumocystis jirovecii pneumonia. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1118–22.
24. Ogawa, M., Hori, H., Niiguchi, S., Azuma, E. och Komada, Y. 2004. False positive plasma (1→3)-β-D-Glucan following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow recipient. Int. J. Hematol. 80: 97–98.
25. Racil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, I. och Mayer, J. Difficulties in using 1,3-{beta}-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. J. Med. Microbiol. 2010; 59:1016–22.
26. Posteraro B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi,M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sanguinetti, M. och Antonelli, M. 2011 Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-β-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. Crit Care.15: R249.
27. Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A. och Steinbach, W.J. 2007. (1→3)-β-D-Glucan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-glucan test in children. Clin. Vaccine Immunol. 14: 924–925.
28. Goudjil. S., Kongolo, G., Dusol, L., Imestouren, F., Cornu, M., Leke, A. och Chouaki, T. 2013. (1→3)-β-D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. J. of Maternenal-Fetal and Neonatal Med. 26: 44–48.
29. Issa, N.C., Koo, S., Lynch, R.C., Gay, C., Hammond, S.P., Baden, L.R., Ghobrial, I.M., Finkelman, M.A. och Marty, F.M... 2012 Serum galactomannan and (1->3)-β-D-glucan assays for patients with multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia. J.Clin. Microbiol. 50:1054–6.
30. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011; 52:750–70.
31. Hou TY, Wang SH, Liang SX, Jiang WX, Luo DD, Huang DH. The Screening Performance of Serum 1,3-Beta-D-Glucan in Patients with Invasive Fungal Diseases: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. PLoS One. 2015 Jul 6;10:e0131602.
32. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O. β-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). Clin Infect Dis. 2012; 54:633–43.
33. Onishi A1, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2012; 50:7–15.
34. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39–49.
35. He S1, Hang JP2, Zhang L2, Wang F2, Zhang DC3, Gong FH4 A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-β-d-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. J Microbiol Immunol Infect; 2015 Aug;48:351–61.
36. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39–49.
37. He S1, Hang JP2, Zhang L2, Wang F2, Zhang DC3, Gong FH4 A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-β-d-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. J Microbiol Immunol Infect; 2015 Aug;48:351–61.
38. Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of the Limulus Amebocyte Lysate Assay and Role of (1→3)-β-D Glucan. PLoS One. 2016 Oct 20;11(10):e0164978. doi: 10.1371/journal.pone.0164978. eCollection 2016.